Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 57-78

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص.۷۸-۵۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Evaluation of Behavior and Modeling of Curcumin Release from Liposomes under Simulated Gastrointestinal Laboratory Conditions

S.F. Mousavi Baygi[1], A. Koocheki[2*], B. Ghorani[3], M. Mohebbi[4]

Received: 2021.11.30
Revised: 2021.12.11
Accepted: 2021.12.12
Available Online: 2021.12.12

How to cite this article:
Mousavi Baygi, S.F., Koocheki, A., Ghorani, B., & Mohebbi, M. (2023). Evaluation of behavior and modeling of curcumin release from liposomes under simulated gastrointestinal laboratory conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 19*(1): 57-78. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.73945.1118

Introduction

Curcumin, as a natural polyphenolic nutraceutical has been shown many health-promoting effects, mainly associated with its chemical structure. In various studies, different properties of this compound, including anti-tumor and anti-cancer activity, reduction of blood and liver cholesterol levels, increase of immune function, prevention of cardiovascular diseases, prevention of damage to biological membranes against peroxidation and anti-inflammatory properties have been reported. Despite possessing a potential health benefits to humans, the susceptibility of this polyphenol towards environmental conditions and low chemical stability has restricted the direct usage of curcumin into aqueous-based food formulations. The encapsulation of curcumin in liposomes is a potentially effective way to protect them from degradation during passing the digestive system.

Materials and Methods

Curcumin (powder, purity greater than 99%, 368.38 g/mol), lecithin, cholesterol (C3045-25G), pancreacin (extracted from porcine pancreas, P7545-25G), bile salts (B8756-10G) and calcium chloride ($CaCl_2$) was obtained from Sigma Aldrich (USA). Consumable ethanol was purchased from Pars Ethanol Company (96%, Iran). Lipase enzyme (extracted from pig pancreas, L8070) and pepsin (activity 3500-3000 NFU/g, P8390) were obtained from Solarabio (China). Potassium chloride, dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4) and alpha-amylase enzyme with a purity of at least 99% were obtained from Merck, Germany, sodium chloride (NaCl), sodium bicarbonate (NaHCO3) and calcium chloride were obtained from Sigma. The effect of lecithin content (0.02- 0.08 g), lecithin cholesterol ratio (0.5- 4), curcumin level (1.5-6mg) and ultrasound treatment time (1-5 minutes) on production of liposomes containing curcumin was evaluated. The particle size, particle size distribution, zeta potential and efficiency were determined by response surface methodology. Furthermore, physical nature, molecular structure, physical stability at 4ºC and 25ºC and release behavior of curcumin loaded-liposome in mouth, stomach and intestines were explored.

Results and Discussion

The results showed that all independent variables had a significant effect on liposome particle size and increasing the ratio of lecithin: cholesterol caused more uniform particle size. Lecithin was determined to be the only component affecting the zeta potential of liposome particles, and increasing the ultrasound time increased the efficiency of curcumin encapsulation in liposomes. The optimal point of liposome preparation conditions in the amount of 0.08 g lecithin, 4: 1 the ratio of lecithin: cholesterol, 4.16 mg curcumin and 5 minutes the ultrasound treatment was introduced by Design Expert software. In addition, curcumin was amorphous in optimal liposome spherical particles. Furthermore, the results of TEM showed that the liposomes are in the form of single-layer particles, spherical and without membrane rupture. This

1, 2 and 4- Former Ph.D. Student and Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: koocheki@um.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), km 12 Mashhad-Guchan Highway, PO box: 91895-157-356, Mashhad, Iran
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.73945.1118

makes the bilayered nature of the vesicles clearly visible in this micrograph. The size of the particles obtained from this method was consistent with the data obtained from the dynamic light scattering method. From the results of infrared spectroscopy, it can be seen that curcumin is trapped in the liposome through hydrogen bonding in the double-layered vesicle of the liposome, the phenolic ring of curcumin with the phospholipid head group, as well as the hydrophobic interactions of the aromatic rings with the acyl phospholipid chains. Liposomes were more stable at refrigeration temperature. A very small amount of curcumin was released in the simulated oral phase, which is probably due to the short time and lack of specific enzymes to disrupt the phospholipid bilayers of the liposome. Although the pepsin enzyme is unable to penetrate the liposome membrane, acidic conditions change the angle of the head and tail groups of the lipids and lead to a change in the surface charge of the liposomes. The release of curcumin from liposome vesicles was greatly increased in the intestine. This sudden increase is due to the presence of bile salts as an emulsifying agent that can disrupt the phospholipid membrane and make the membrane more fluid. In addition, pancreatic lipase is adsorbed on the surface of lipids and then hydrolyzes the phospholipid into 2-acyl and 1-acyl lysophospholipids and free fatty acids. The release behavior of curcumin under gastrointestinal conditions was based on the Fick mechanism.

Keywords: Curcumin, Liposome, Optimization, Release behavior

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص. ۷۸-۵۷

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 57-78

مقاله پژوهشی

توسعه و ارزیابی خصوصیات لیپوزوم بهینه‌یابی شده جهت درون‌پوشانی کورکومین

سیده فاطمه موسوی بایگی[۱]- آرش کوچکی[۲*]- بهروز قرآنی[۳]- محبت محبی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱

چکیده

کورکومین به‌عنوان یک ترکیب زیست فعال چربی‌دوست دارای خواص سلامتی‌بخش ویژه‌ای می‌باشد اما پایداری کم و حساسیت بالای آن موجب محدودیت دسترسی زیستی این ماده شده است. هدف از این پژوهش طراحی و توسعه سیستم حامل لیپوزومی جهت ریزپوشانی کورکومین است. درون پوشانی ترکیبات حساس از جمله کورکومین در ساختار لیپوزومی، می تواند روشی موثر بر حفاظت آنها طی شرایط هضم دستگاه گوارشی باشد. هدف از این پژوهش، ارزیابی تاثیر میزان لستین (۰/۰۸- ۰/۰۲ گرم)، نسبت لستین: کلسترول (۴- ۰/۵)، میزان کورکومین (۶- ۱/۵ میلی‌گرم) و زمان تیمار فراصوت (۵- ۱ دقیقه) بر تولید لیپوزوم‌های حاوی کورکومین بود. نمونه بهینه با آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده درون پوشانی به روش تکنیک سطح پاسخ تعیین گردید و سپس ماهیت فیزیکی، ساختار مولکولی و همچنین رفتار رهایش کورکومین درون پوشانی شده در سه شرایط شبیه سازی دهان، معده و روده برای نمونه بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه متغیرهای مستقل بر اندازه ذرات لیپوزوم دارای اثر معنی‌دار (p<۰/۰۱) بود و افزایش نسبت لستین: کلسترول موجب یکنواختی هرچه بیشتر اندازه ذرات گردید. لستین تنها جزء اثرگذار بر پتانسیل ذرات تعیین شد و افزایش زمان امواج فراصوت موجب افزایش بازده درون پوشانی کورکومین در لیپوزوم گردید. نقطه بهینه تهیه لیپوزوم با بالاترین بازده درون پوشانی (۱/۰± ۶۹/۰۲ درصد) وکمترین اندازه ذرات (۰/۰۹± ۲۱۴/۱۷۴ نانومتر)، توزیع اندازه ذرات (۰/۰۲± ۰/۱۰۵) و پتانسیل زتا (۰/۳۱± ۱۶/۵۴۱- میلی‌ولت) در شرایط میزان لستین ۰/۰۸ گرم، نسبت لستین: کلسترول ۴:۱، میزان کورکومین ۴/۱۶ میلی‌گرم و تیمار فراصوت ۵ دقیقه توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت معرفی شد. کورکومین در ذرات کروی لیپوزوم بهینه به حالت آمورف بود. پایداری این لیپوزوم‌ها طی زمان تحت تاثیر دما بوده به‌طوری که در مقایسه با دمای ۴درجه سانتی‌گراد، کورکومین بیشتری از لیپوزوم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رهایش یافته بود. همچنین رفتار رهایش کورکومین در شرایط دستگاه گوارش اساس مکانسیم انتشار بود.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌یابی، رفتار رهایش، کورکومین، لیپوزوم

مقدمه

امروزه به اهمیت ترکیبات زیست فعال و خواص سلامتی‌زایی آنها بیشتر توجه می‌شود، با این حال بی‌ثباتی این ترکیبات طی فرآوری (دما، اکسیژن و نور)، ذخیره‌سازی و همچنین شرایط سامانه گوارشی (اسید، آنزیم و حضور دیگر مواد مغذی)، کاربرد آن‌ها را محدود می‌کند (Jahanshahi and Mehravar, 2009). رنگ زردچوبه توسط گروهی از پلی‌فنول‌ها به نام کورکومینوییدها ایجاد شده است که شامل ۷۷ درصد کورکومین، ۱۷ درصد دی‌متوکسی کورکومین و ۳ درصد بیس دمتوکسی کورکومین است (Adhikary *et al*., 2011). بر اساس تحقیقات انجام شده کورکومین یک ترکیب طبیعی آبگریز و دارای ویژگی‌های عملکردی چشمگیری می‌باشد و در مطالعات مختلف خواص متفاوتی از این ترکیب از جمله فعالیت ضدتوموری و ضدسرطانی، کاهش سطح کلسترول خون و کبد، افزایش عملکرد ایمنی بدن، جلوگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی، جلوگیری از آسیب

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استادان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی (RIFST)، کیلومتر ۱۲ بزرگراه آسیایی مشهد-قوچان، صندوق پستی: ۳۵۶-۱۵۷-۹۱۸۹۵، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: koocheki@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.73945.1118

غشاءهای زیستی در مقابل پراکسیداسیون، خاصیت ضدالتهابی و کاهش آرتروز روماتیسمی و حفاظت در مقابل بیماری آلزایمر گزارش شده است (Ravichandran, 2013). با وجود منافع مذکور برای کورکومین، حلالیت پایین در محیط آبی، حساسیت به شرایط محیطی به‌خصوص pH، دما و پایین بودن دسترسی زیستی این ترکیب در سیستم گوارشی (۱۰ تا ۳۰ درصد کورکومین مصرفی) (Lin et al., 2009; Chavhan et al., 2011) باعث محدودشدن کاربرد این ترکیب در صنایع غذایی شده است. بنابراین، استفاده از یک راهبرد محافظت‌کننده، که مولکول‌ها را تا زمان مصرف به شکل فعالشان حفظ کند و یا آنها را به بافت مورد نظر انتقال دهد، ضروری به‌نظر می‌رسد. در این راستا، سامانه‌های انتقال مواد بر اساس به دام‌اندازی و حفاظت از این مواد مورد توجه هستند. در چند دهه اخیر استفاده از فناوری نانو برای درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال به منظور ویژگی‌های منحصر به‌فرد نانوحامل‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با کاهش اندازه سیستم حامل از میکرومتر به نانومتر، نسبت سطح به حجم به شدت افزایش یافته و منجر به افزایش کارایی درون پوشانی، بهبود دسترسی زیستی ماده کپسوله شده و رهایش کنترل شده و یکنواخت‌تر هسته می‌شود (Mozafari et al., 2008). برای پایداری و بهبود دسترسی زیستی کورکومین، روش‌های متعددی صورت گرفته است برخی از این رویکردها شامل: استفاده از کمک‌کننده‌ها مانند پیپرین که مانع از گلوکورونیده شدن کورکومین می‌شود؛ استفاده از کورکومین لیپوزومی، نانوذرات کورکومین، استفاده از کمپلکس کورکومین فسفولیپید و استفاده از آنالوگ‌های ساختاری کورکومین است (Anand et al., 2007). همچنین برای رهایش محافظت شده و رسانش هدفمند از نانوحامل‌ها مانند حامل‌های لیپید نانوساختار (Madane & Mahajan, 2016)، نانوامولسیون (Qazi et al., 2021)، عوامل چلاته‌کننده (Chen et al., 2014)، میسل‌ها (Zhi et al., 2021) و لیپوزوم (Nakajima et al., 2015) در زمینه درون‌پوشانی کورکومین استفاده می‌شود. از میان روش‌های ارائه شده، لیپوزومها دارای ساختارهای کره‌ای شکل که در آن گروه‌های آبگریز و آبدوست به‌ترتیب در در بخش مرکزی و غشاء کره حضور دارند، هستند (Li et al., 2018). درون‌پوشانی کورکومین در لیپوزوم باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، جذب دستگاه گوارش (Takahashi et al., 2009) و حلالیت در آب (Sun et al., 2012) می‌شود. افزون بر این تحقیقات نشان داده است که تخریب کورکومین در شرایط قلیایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای در لیپوزوم کاهش می‌یابد (El Khoury and Patra, 2013). با توجه به موارد فوق، هدف از این پژوهش بررسی پایداری کورکومین در دو دمای ۴ و۲۵ درجه سانتی‌گراد، درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ارزیابی دسترسی زیستی از طریق به‌دام‌اندازی در لیپوزوم در شرایط سیستم شبیه‌سازی شده دهان، معده و روده است. برای این پژوهش ابتدا شرایط فرآیند تولید لیپوزوم حاوی کورکومین بهینه شد و سپس خصوصیات لیپوزوم بهینه شده بررسی گردید و رهایش آن طی انبارمانی در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط شبیه‌سازی دهان، معده و روده مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کورکومین (پودری، خلوص بیشتر از ۹۹ درصد، ۳۶۸/۳۸ گرم بر مول)، لستین، کلسترول (C3045-25G)، پانکراسین (استخراج شده از پانکراس خوک، P7545-25G)، نمک صفرا (B8756-10G) و کلسیم کلرید ($CaCl_2$) از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) تهیه شد. اتانول مصرفی از شرکت پارس اتانول (۹۶درصد، ایران) خریداری شد. آنزیم لیپاز (استخراج شده از پانکراس خوک، L8070) و پپسین (فعالیت ۳۰۰۰- NFU/g ۳۵۰۰، P8390) از شرکت سولارابیو[1] (چین) تهیه شد. کلرور پتاسیم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (K_2HPO_4) و آنزیم آلفا–آمیلاز با درجهٔ خلوص حداقل ۹۹ درصد از شرکت Merck آلمان، کلرید سدیم (NaCl)، بیکربنات سدیم ($NaHCO_3$) و کلرید کلسیم از شرکت Sigma تهیه شدند.

تهیه لیپوزوم حاوی کورکومین

لیپوزوم حاوی کورکومین طبق روش تزریق اتانول تهیه شد. بر این اساس نسبتی از لستین به کلسترول و کورکومین در اتانول در دمای محیط حل شده و سپس محلول حاصل به‌طور مساوی به محلول بافر فسفات (PBS) به صورت سریع تزریق شد (pH 7.0) و در ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد. با ورود سریع اتانول در محیط آبی و رقیق شدن آن، مولکول‌های لیپید رسوب کرده و ساختار کوچک و تک لایه ای غشاء مانندی تشکیل می شود. در نهایت محلول مخلوط شده به یک فلاسک ته گرد منتقل شد و روی اواپراتور چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا اتانول به طور کامل تبخیر شود. لیپوزوم‌های تهیه شده جهت کاهش اندازه تحت انرژی فراصوت با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (VCX750، SONICS، آمریکا) به مدت معلوم (دقیقه) با توان ۷۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز پراکنده شدند. در این مرحله برای جلوگیری از اثر انرژی بیش از حد امواج صوتی که منجر به سیالیت غشای لیپوزومی و تخریب دیواره می‌شود، نمونه‌ها در حمام یخ قرار داده شد. همچنین برای جلوگیری از شکست غشای لیپوزومی و ایجاد شکل‌گیری مجدد، به

1- Solarbio

ازای هر یک دقیقه سیکل تیمار، یک دقیقه فاصله استراحت داده شد.جهت اندازه گیری بازده لیپوزوم نمونه با دور g × ۱۰۰۰به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر از مایع رویی با ۲ میلی لیتر حلال اتانول رقیق گردید تا محتوای بدون کپسول توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۸ نانومتر مشخص شود. سپس با استفاده از منحنی استاندارد میزان کورکومین محاسبه گردید (Liu *et al*., 2015).

اندازه‌گیری پتانسیل زتا و اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

بار سطحی لیپوزوم‌ها (میلی‌ولت) با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Zeta Compact، CAD، فرانسه) ارزیابی گردید. جهت جلوگیری از پراکنش نور، از آب دیونیزه با نسبت ۱:۵۰ حجمی/ حجمی جهت رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شد. تمامی نمونه‌ها بلافاصله پس از تهیه با ۲ تکرار اندازه‌گیری شدند و سپس میانگین آن‌ها گزارش گردید. قطر متوسط و توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها بادستگاه Particle Size Analyzer (Vasco3، Cordouan، فرانسه) اندازه‌گیری شد.

میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)

جهت بررسی ریزساختار لیپوزوم بهینه از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Leo 906، Zeiss 100 KV، آلمان) استفاده شد. در ابتدا یک قطره از نمونه لیپوزوم رقیق شده (نسبت ۱:۲۰۰) بهینه بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شد (Klang *et al*., 2012).

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)

به‌منظور تائید حضور کورکومین در لیپوزوم، بررسی ساختار مولکولی و نیز برهمکنش‌های احتمالی بین ماتریس لیپوزوم و کورکومین بارگذاری شده، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه اجرا شد. ۱ میلی‌گرم از نمونه خشک شده لیپوزم حامل کورکومین به روش انجمادی با پتاسیم بروماید (KBr) با نسبت ۱:۱۰۰ مخلوط شد و تحت فشار از آن قرص تهیه گردید و سپس با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز (Thermo Nicolet، ۳۷۰، آمریکا) آنالیز شد. طیف مادون قرمز در محدود ۶۰۰ الی $4000\ cm^{-1}$ ارزیابی گردید.

طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD)

بررسی تفرق اشعه ایکس در دمای اتاق بر روی نمونه خشک شده به روش انجمادی انجام شد. بدین منظور از دستگاه پراش‌دهنده X (Pert PANalytical، آمریکا) تحت ولتاژ ۴۰ کیلوولت و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر استفاده گردید.

پایداری فیزیکی

پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها در طی انبارمانی در دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط انکوباتور اندازه‌گیری شد. بدین منظور میزان رهایش کورکومین در فواصل زمانی معین (صفر (بلافاصله پس از تولید)، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) با اسپکتروفتومتری تعیین و مطابق با رابطه ۳-۷ اندازه‌گیری گرد (Lu *et al*., 2014). به‌منظور تعیین مقدار کورکومین، نمونه برداشته شده جهت قرائت جذب با اتانول به‌عنوان حلال مخلوط گردید و پس از سانتریفوژ کردن، جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-visible light spectrophotometer، Hanch، ایالات متحده آمریکا) اندازه‌گیری شد. درصد رهایش تجمعی کورکومین از تقسیم مقدار کل کورکومین آزاد شده از ابتدا تا زمان t (Mt) به وزن اولیه کورکومین بارگذاری شده در لیپوزوم (M0)، محاسبه شد:

$$\text{درصد رهایش تجمعی} = \sum_{t=0}^{t} \frac{M_t}{M_0} \times 100 \qquad (1)$$

بررسی رهایش در شرایط شبیه‌سازی شده دهان، معده و روده

جهت بررسی رفتار رهایش در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش ۶ میلی‌لیتر از نمونه در داخل کیسه دیالیز (۱۲ کیلو دالتون، ۲۵ قطر میلی‌متر، سیگما، آلمان) در سه مرحله شبیه‌سازی دهان، شبیه‌سازی معده و شبیه‌سازی روده قرار گرفت. جهت فاز دهانی، بزاق مصنوعی تهیه گردید ۱/۳۶۹ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۸۷۷ گرم کلریدسدیم، ۰/۴۴۱ گرم کلسیم کلرید دی‌هیدرات، ۲/۱۶۰ گرم موسین، ۵/۲۰۸ گرم بی‌کربنات سدیم،۰/۴۷۷ گرم کلریدپتاسیم و ۲۰۰۰۰۰ واحد آنزیم آلفاآمیلاز به یک لیتر آب مقطر باpH ۷ اضافه شد (Van Ruth *et al*., 1994). جهت شبیه‌سازی حرکات مکانیکی دهان نمونه به‌طور مداوم در دور ۱۰۰ بر ثانیه با همزن مغناطیسی به مدت ۲/۵ دقیقه همزده شد. پس از آن نمونه وارد محیط شبیه‌سازی معده با mg/ml ۳/۲ پپسین، mg/ml ۲/۰ کلرور سدیم با pH ۱/۲ به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. بعد از عبور از این مرحله نمونه وارد محلول شبیه‌سازی روده با mg/ml ۲/۰ پانکراسین، mg/ml ۱۲/۰ نمک های صفراوی، mg/ml ۸/۸ سدیم کلرید، mg/ml ۲۴/۰ و ۰/۲۵ مولار کلرور کلسیم با pH تنظیم شده ۷ به مدت ۲و نیم ساعت قرار گرفت. در تمام مدت دمای فرآیند ۳۷ درجه ثابت نگه داشته شد (Ahmed *et al*., 2012; Chen *et al*., 2020). سپس میزان کورکومین از رابطه ۱ محاسبه شد.

مدل‌سازی رهایش

برای بررسی رهایش کورکومین از لیپوزوم و ارزیابی سرعت رهایش آن، از مدل‌های مختلفی شامل معادلهٔ درجهٔ صفر[1]، کوپچا[2]، پپاس سالهین[3] و هیگوچی[4] استفاده شد.

$$C = K_0 t \quad (۲)$$

$$M_t = A\times t^{0.5} + B\times t \quad (۳)$$

$$\frac{Mt}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad (۴)$$

$$C = K_H t^{0.5} \quad (۵)$$

در این روابط t برابر زمان رهایش برحسب دقیقه، C غلظت کورکومین آزادشده در زمان t، n توصیف‌کننده فرایند رهایش و K_0 ثابت کینتیکی برای معادله درجه صفر، و K_H ثابت هیگوچی بوده و K_1 و K_2 ثابت کنیتیکی فیک و ثابت نرخ فرسایش است. پارامتر n مشخص‌کننده مکانیسم‌های مختلف رهایش است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش به‌منظور مطالعه بهینه‌یابی تهیه لیپوزوم از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی برای پارامتراهای موثر استفاده شد. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای وابسته در مدل رگرسیونی با متغیر مستقل، نمودار سطوح آنها به‌وسیله نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ترسیم گردید. به‌منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده، آزمون ضعف برازش، ضریب تغییرات و ضریب تبیین و میزان معناداری تعیین گردید. علاوه بر بررسی رفتار متغییرها بر خصوصیات لیپوزوم‌های به‌دست آمده، مدل‌های به‌دست آمده نیز می‌توانند به‌منظور بهینه‌سازی مورد استفاده قرار بگیرند. لذا بهینه‌یابی عددی بر مبنای بیشترین بازده درون پوشانی، کمترین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات و میزان پتانسیل زتا انجام شد. برای بهینه‌یابی عددی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۶،۰،۲ (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minn., USA) طراحی و مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. به‌منظور تائید صحت مدل‌ها، اعداد پیش بینی شده و تجربی با استفاده از آمون t student و نرم‌افزار Minitab با یکدیگر مقایسه شدند. به‌منظور ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده گردید. همچنین برازش داده‌های آزمایشگاهی حاصل از رهایش کورکومین با استفاده از معادله‌های تجربی و به کمک نرم‌افزار Matlab (نسخهٔ 2018 b) صورت گرفت و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی، بهترین مدل انتخاب و پیشنهاد شد.

نتایج و بحث

بهینه‌یابی درون پوشانی کورکومین درون لیپوزوم

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (میزان کورکومین، میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول و تیمار فراصوت) بر متغیرهای وابسته (تغییرات اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده درون پوشانی کورکومین) طی فرآیند تهیه لیپوزوم از طرح سطح پاسخ با نقاط حداکثر، میانی و حداقل استفاده شد (جدول ۱). برای هریک از متغیرهای وابسته، مدل‌های سطح پاسخ مختلفی با الگوی حذف پسخور برازش گردید تا بهترین مدل انتخاب شود. در این روش، مدل‌های اثرات خطی، میانگین پاسخ، دو فاکتوریلی (تعاملی)، درجه دوم و درجه سوم مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). در روش سطح پاسخ، ضرایب مدل با استفاده از روش رگرسیونی چندگانه و حداقل مربع‌ها محاسبه و سپس پاسخ تخمین زده شده با استفاده از رابطه مدل محاسبه گردید. صحت هر مدل پیشنهاد شده از ضریب تبیین و آزمون عدم برازش ارزیابی گردید. مقدار ضریب تبیین بین صفر و یک متغیر است به‌طوری که هرچه این عدد به یک نزدیک‌تر باشد یعنی مدل با دقت بالایی تقریبا تمامی داده‌ها را برازش می‌کند. با اینکه ضریب تبیین به‌دست آمده برای پاسخ پتانسیل زتا ۰/۷۸ درصد بود، اما پاسخ‌های اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و بازده درون پوشانی کورکومین به‌ترتیب ۰/۸۵، ۰/۹۰ و ۰/۸۲ بود که نشان‌دهنده این است که داده‌های تجربی به‌خوبی با مدل برازش شدند (جدول ۳). ضریب تغییرات یک مدل نسبت جذر مجموع مربعات خطا به میانگین متغیر پاسخ می‌باشد و بیانگر میزان پراکنش داده‌ها است. مقدار کم ضریب تغییرات (کمتر از ۱۰ درصد) نشانگر برازش بهتر مدل و کوچک بودن مقادیر باقی مانده نسبت به مقادیر پیش‌بینی شده و نزدیکی مقادیر پیش‌بینی شده به مقادیر واقعی است. در پژوهش حاضر تمامی ضرایب تغییرات به جز توزیع اندازه ذرات (۱۰/۸۶) و پتانسیل زتا (۱۱/۴۲-) کمتر از ۱۰ درصد بود که بیانگر دقت و اعتبار آزمایشات است (جدول ۳). در این پژوهش، آزمون عدم برازش برای تمامی مدل‌های ارائه شده در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌داری نبود، که در این آزمون عدم برازش بیانگر صحت مدل در پیش‌بینی پاسخ‌ها است (جدول ۴).

---

1 Zero-order
2 Kopcha
3- Peppas-Salhin
4- Higuchi

جدول ۱- نتایج طرح مرکب مرکزی برای متغیرهای مستقل و وابسته فرآیند تهیه لیپوزوم

Table 1- The results of the central composite design for the independent and dependent variables of the liposome preparation process

Row	Lecithin (A) (g) لسیتین	Lecithin: Cholesterol (B) لسیتین:کلسترول	Curcumin (C) (mg) کورکومین	Ultrasound treatment (D) (min) تیمار فراصوت	Size (Nnometer) اندازه	Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	Zeta potential (mV) پتانسیل زتا	Efficiency (Percent) راندمان
1	0.05	2.25	3.75	3.00	253.41	0.15	-12.51	66.78
2	0.02	0.50	6.00	5.00	251.88	0.23	-8.87	69.09
3	0.08	2.25	3.75	3.00	238.18	0.12	-15.72	71.01
4	0.08	4.00	6.00	5.00	215.03	0.13	-16.60	67.28
5	0.05	0.50	3.75	3.00	245.16	0.12	-12.56	69.70
6	0.02	0.50	1.50	5.00	249.52	0.25	-10.56	67.56
7	0.05	2.25	3.75	5.00	245.39	0.14	-12.17	71.61
8	0.02	4.00	1.50	5.00	245.11	0.21	-11.28	74.72
9	0.08	4.00	1.50	1.00	221.79	0.20	-19.50	64.34
10	0.05	2.25	1.50	3.00	262.13	0.24	-11.47	68.34
11	0.02	4.00	6.00	1.00	271.88	0.14	-9.51	73.01
12	0.05	2.25	3.75	3.00	245.54	0.13	-11.75	66.65
13	0.05	2.25	3.75	1.00	259.20	0.12	-12.59	68.59
14	0.05	2.25	3.75	3.00	254.26	0.12	-13.91	70.36
15	0.05	4.00	3.75	3.00	235.36	0.10	-13.57	71.34
16	0.08	0.50	1.50	5.00	225.66	0.27	-14.16	70.86
17	0.02	4.00	1.50	1.00	264.07	0.20	-10.02	70.98
18	0.08	0.50	6.00	1.00	242.40	0.16	-18.16	69.31
19	0.02	2.25	3.75	3.00	279.25	0.10	-8.19	70.43
20	0.05	2.25	6.00	3.00	276.34	0.15	-12.36	70.11
21	0.05	2.25	3.75	3.00	271.06	0.14	-13.76	67.72
22	0.05	2.25	3.75	3.00	250.20	0.09	-10.27	70.65
23	0.05	2.25	3.75	3.00	257.10	0.10	-12.21	69.96
24	0.08	0.50	1.50	1.00	234.01	0.23	-15.21	65.99
25	0.08	0.50	6.00	5.00	231.76	0.18	-17.45	73.28
26	0.02	0.50	1.50	1.00	250.49	0.23	-8.31	59.47
27	0.08	4.00	1.50	5.00	210.00	0.23	-15.91	69.10
28	0.02	4.00	6.00	5.00	248.85	0.15	-11.56	76.82
29	0.08	4.00	6.00	1.00	225.30	0.13	-19.81	63.23
30	0.02	0.50	6.00	1.00	286.32	0.17	-11.12	60.12

اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های مورد بررسی

اندازه ذرات

بر اساس مدل اندازه ذرات لیپوزوم، اثرات خطی میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول، میزان کورکومین و تیمار فراصوت و همچنین اثر درجه دوم نسبت لستین: کلسترول معنی‌دار شد ($p<0/01$). ضرایب معادلات مدل‌های به‌دست آمده و تجزیه واریانس آن‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، هیچ اثر متقابلی بین متغیرهای مستقل مشاهده نشد. رابطه بین اندازه ذرات با متغیرهای مستقل به صورت دو به دو در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل ۱ نشان داده شده است. در مدل درجه دوم انتخاب شده، با افزایش متغیر مستقل میزان لستین، اندازه ذرات به‌صورت خطی کاهش یافت. تاثیر لستین بر اندازه لیپوزوم‌ها ممکن است ناشی از پدیده‌های مختلف از جمله، اندازه و بار گروه‌های فسفولیپیدی باشد که بر قرارگیری[1]، برهمکنش[2] و انحنای بهینه[3] لایه‌های فسفولیپیدی تاثیر می‌گذارد و همچنین وجود برخی از اجزای غیرفسفولیپیدی در نمونه‌های لستین مانند پروتئین‌ها و یا یون‌های معدنی باشد که ممکن است در تشکیل لیپوزوم تداخل داشته باشند (Peng *et al*., 2018). بر اساس یافته‌های شوبرت و همکاران (Schubert *et al*., 2006)، تاثیر لستین بر کاهش اندازه ذرات تا غلظتی می‌باشد که هندسه شکل لیپوزوم تغییر کند و افزایش بیش از حد آن تاثیری بر اندازه ذرات ندارد (Schubert *et al*., 2006).

1- Packing
2- Interactions
3- Optimum Curvature

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس مدل‌های برازش یافته بر داده‌های پاسخ فرآیند تهیه لیپوزوم

Table 2- The results of the variance analysis of the fitted models on the response data

Response پاسخ	**Source** منبع	**Sum of squares** مجموع مربعات	**Degrees of freedom** درجه آزادی	**Average of squares** میانگین مربعات	**F**	**Probability of F** احتمالF
Particle size اندازه ذرات	Average میانگین	1.85E+00	1	1.85E+00		
	Linear خطی	6854.58	4	1713.64	13.12	<0.0001
	2FI	469.39	6	78.23	0.53	0.7777
	Quadratic درجه ۲	**2110.03**	**4**	**527.51**	**11.52**	**0.0002**
	درجه ۳	224.12	8	28.01	0.42	0.8741
	Residual باقیمانده	462.96	7	66.14		
	Total مجموع	1.85E+00	30	61951.36		
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	Average میانگین	0.80	1	0.80		
	Linear خطی	0.031	4	7.63E-003	3.81	0.0149
	2FI	1.76E-003	6	2.93E-004	0.12	0.9934
	Quadratic درجه ۲	**0.043**	**4**	**0.011**	**33.75**	**<0.0001**
	درجه ۳	1.75E-003	8	2.18E-004	0.50	0.8267
	Residual باقیمانده	3.09E-003	7	4.40E-004		
	Total مجموع	0.89	30	0.03		
Zeta potential پتانسیل زتا	Average میانگین	5097.86	1	5097.86		
	Linear خطی	**234.68**	**4**	**58.67**	**30.19**	**<0.0001**
	2FI	15.48	6	2.58	1.48	0.2375
	Quadratic درجه ۲	13.07	4	3.27	2.45	0.0916
	درجه ۳	8.52	8	1.07	0.65	0.7224
	Residual باقیمانده	11.51	7	1.64		
	Total مجموع	5381.11	30	179.37		
Efficiency راندمان	Average میانگین	1.43E+00	1	1.43E+00		
	Linear خطی	159.83	4	39.36	3.95	0.0128
	2FI	**199.88**	**6**	**33.31**	**11.94**	**<0.0001**
	Quadratic درجه ۲	8.15	4	2.04	0.68	0.6159
	درجه ۳	17.52	8	2.91	0.56	0.7828
	Residual باقیمانده	27.36	7	3.91		
	Total مجموع	1.43E+00	30	4767.45		

جدول ۳- نتایج آنالیز آماری مدل‌های انتخاب شده برای هر یک از داده‌های پاسخ

Table 3- The results of the statistical analysis of the selected models for each of the response data

Response پاسخ	R^2 adj (Adjusted R-squared) ضریب تبیین تعدیل شده	R^2 (Coefficient of Determination) ضریب تبیین	Coefficient of variation ضریب تغییرات	Standard deviation انحراف معیار	Average میانگین
Particle size اندازه ذرات	0.82	0.85	3.16	7.85	248.22
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	0.88	0.90	10.84	0.02	0.16
Zeta potential پتانسیل زتا	0.77	0.78	-11.42	1.49	-13.04
Efficiency راندمان	0.80	0.83	2.46	1.70	68.97

نتایج نشان داد که ابتدا با افزایش نسبت لستین به کلسترول از ۰/۵ به ۲/۲۵، اندازه ذرات افزایش و سپس با افزایش هرچه بیشتر این نسبت از ۲/۲۵ به ۴، اندازه ذرات کاهش یافت (شکل ۱). کلسترول باعث پایداری و تثبیت لیپوزوم‌های تشکیل یافته می‌گردد و حضور آن در ساختار دولایه منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود (Mohammadi *et al.*, 2014). به‌طور کلی هنگامی که نسبت مناسبی از کلسترول به‌عنوان ماده غشاء اضافه می‌شود، ساختار دو لایه لیپیدی تقویت شده و موجب کاهش اندازه ذرات می‌شود (Lu *et al.*, 2011). مشابه با این نتایج، چن و همکاران (Chen *et al.*, 2019) گزارش کردند با افزایش نسبت لستین به کلسترول از ۱:۲ به ۱:۶ میانگین اندازه ذرات لیپوزومی حاوی کوئرستین به طرز چشمگیری کاهش یافت. علاوه بر این چی و همکاران (Chen *et al.*, 2019) اعلام داشتند که با افزایش نسبت لستین به کلسترول (۵/۹۶: ۱) اندازه نانوذرات لیپوزومی حاوی آنتوسیانین کاهش می‌یابد.

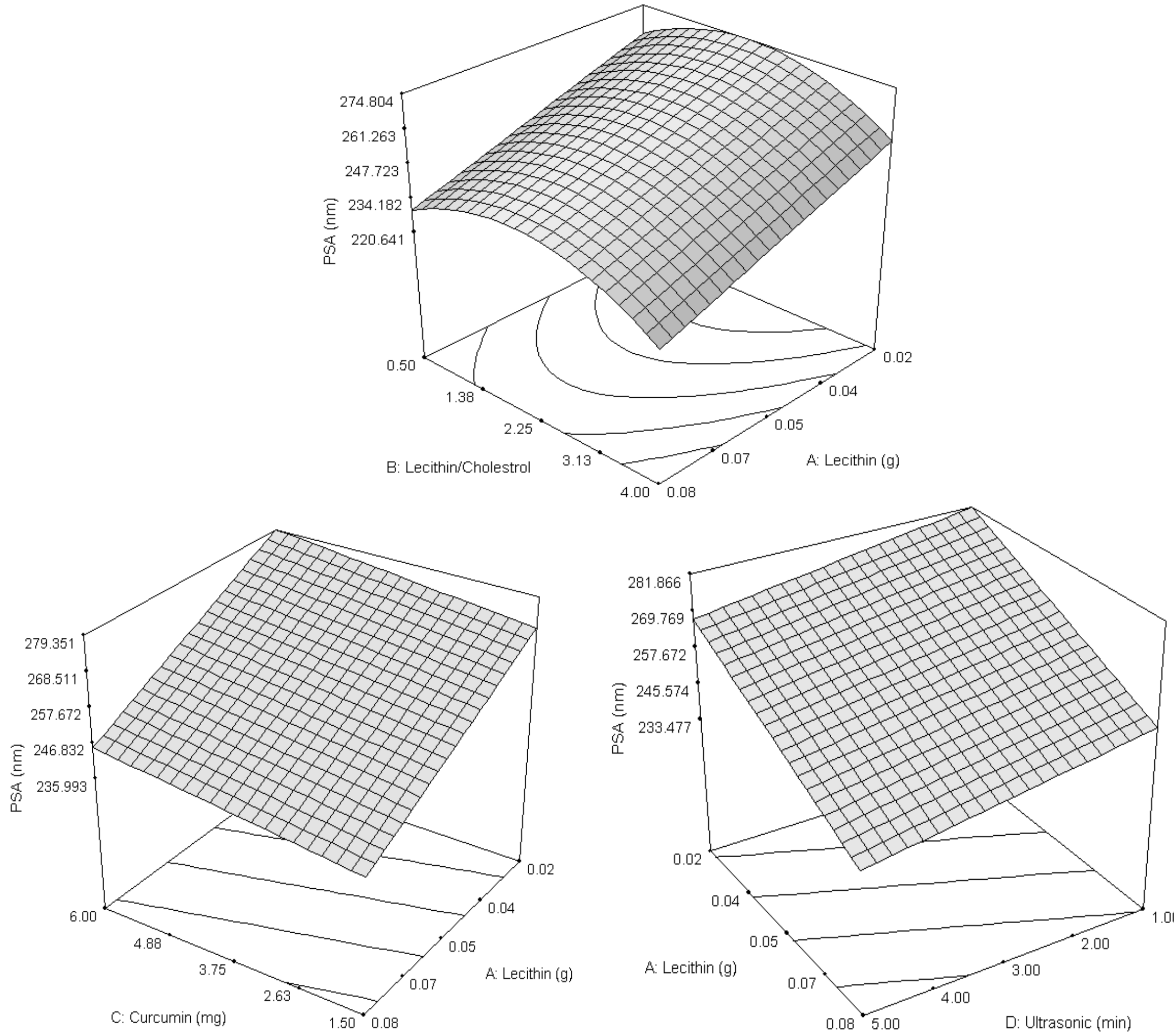
اندازه لیپوزوم‌ها تحت تاثیر میزان کورکومین ارزیابی شد. با افزایش میزان کورکومین از ۱۵ به ۶۰ میلی‌گرم اندازه ذرات به صورت خطی افزایش یافت (شکل ۱). به احتمال زیاد مقدار ماده موثره چربی‌دوست می‌تواند به علت واکنش با گروه‌های قطبی زنجیره آسیل لیپیدی بر ساختار غشای لیپوزومی و اندازه آن تاثیر بگذارد (Chi *et al.*, 2019). علاوه بر این ترکیبات فنلی که گروه‌های هیدروکسیل فنولیک را حمل می‌کنند کورکومین به‌عنوان یک مولکول آبگریز بین دو لایه چربی لیپوزوم قرار گرفته و با برهمکنش بین زنجیره‌های آسیل، اندازه نانولیپوزوم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. همچنین گروه‌های O– آنها می‌توانند با گروه‌های کولین سر فسفولیپیدها با بار مثبت پیوندهای هیدروژنی یا پیوندهای یونی پایداری برقرار کرده و به‌طور موثری موجب تغییرات سازه‌ای در ساختارهای دو لایه لیپوزومی شوند (Wink *et al.*, 2010). همچنین بارگذاری ترکیبات فنلی در دو لایه بر روی مدول الاستیک و سیالیت غشا تاثیر می‌گذارد (Rafiee *et al.*, 2017; Olbrich *et al.*, 2000). نهر همکاران (Nahr *et al.*, 2019) اعلام کردند که با افزایش میزان مولکول‌های آبگریز در ساختار منظم لستین در غشای لیپوزوم سیالیت غشا و اندازه ذرات لیپوزومی افزایش می‌یابد. کارویچ و همکاران (Karewicz *et al.*, 2011) گزارش کردند که افزایش کورکومین موجب سفتی دولایه وزیکولی شده و باعث افزایش قطر لیپوزوم می‌شود (Karewicz *et al.*, 2011). محدوده اندازه ذرات در این پژوهش ۲۱۰/۰۰ –۲۸۶/۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. در مطالعات گذشته، میانگین اندازه ذرات لیپوزوم‌های حاوی کورکومین تهیه شده با لستین سویا را ۲۷۱/۳ نانومتر با توزیع اندازه ذرات ۰/۵۱۲ گزارش شده است (Ng *et al.*, 2018). جین و همکاران (Jin *et al.*, 2016)، اندازه ذرات (۴۷۱/۴ نانومتر) و توزیع اندازه ذرات (۰/۴۹۹) را در لیپوزوم‌های حاوی کورکومین اندازه‌گیری کردند.

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیون مدل انتخاب شده برای متغیرهای پاسخ

Table 4- Results of analysis of variance and regression coefficients of the selected model for response variables

Source منبع	Sum of squares مجموع مربعات	Degrees of freedom درجه آزادی	Average of squares میانگین مربعات	F	Probability of F احتمالF
Particle size **اندازه ذرات**					
Model مدل	8640.63	5	1728.13	28.02	<0.0001
A	5108.58	1	5108.58	82.82	<0.0001
B	353.87	1	358.87	5.74	0.0248
C	420.31	1	420.31	6.81	0.0153
D	971.82	1	971.82	15.75	0.0006
B2	1786.05	1	1786.05	28.95	<0.0001
Residual باقیمانده	1480.45	24	61.69		
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	1102.92	19	58.05	0.77	0.6949
Total مجموع	10121.07	29			
Particle size distribution **توزیع اندازه ذرات**					
Model مدل	0.07	4	0.02	57.64	<0.0001
B	7.12E-003	1	7.12E-003	22.58	<0.0001
C	0.02	1	0.02	67.52	<0.0001
D	2.09E-003	1	2.09E-003	6.63	0.0163
C2	0.04	1	0.04	133.84	<0.0001
Residual باقیمانده	7.88E-003	25	3.15E-004		
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	4.90E-003	20	2.45E-004	0.41	09292
Total مجموع	0.08	29			
Zeta potential **پتانسیل زتا**					
Model مدل	221.20	1			
A	221.20	1	221.20	99.81	<0.0001
Residual باقیمانده	62.05	28	221.20	99.81	<0.0001
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	52.92	23	2.22		
Total مجموع	283.25	29	2.30	1.26	0.4352
Efficiency **راندمان**					
Model مدل	340.79	4	85.20	29.61	<0.0001
A	3.38	1	3.38	1.17	0.2888
B	35.96	1	35.96	12.49	0.0016
D	113.90	1	113.90	39.58	<0.0001
AB	187.55	1	187.55	65.17	<0.0001
Residual باقیمانده	71.94	25	2.88		
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	54.95	20	2.75	0.81	0.6711
Total مجموع	412.74	29			

$$PSA= +357.67 - 16.85*A - 4.43*B + 4.83*C - 7.35*D - 15.75*B^2$$



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لسیتین، نسبت لسیتین: کلسترول، میزان کورکومین و زمان فراصوت بر اندازه ذرات لیپوزومی

Fig. 1- The response surface diagram of the variable effect of lecithin, lecithin: cholesterol ratio, curcumin amount and ultrasound time on the size of liposomal particles.

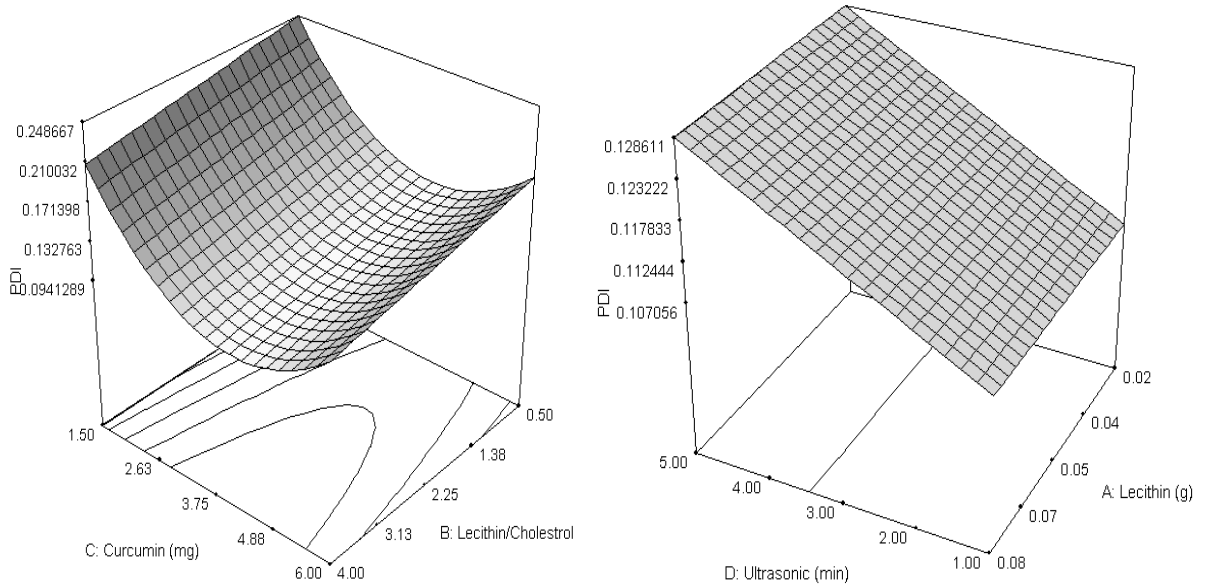
تیمار فراصوت معمولا در جهت تهیه وزیکول‌های لیپوزوم تک لایه‌ای استفاده می‌شود. نتایج نشان داد که افزایش زمان متغیر تیمار فراصوت منجر به کاهش اندازه ذرات لیپوزومی حاوی کورکومین شد ($p<۰/۰۰۱$). میدان برشی و امواج موئینگی حاصل از تشکیل و فروپاشی حباب‌های ریز هوا ناشی از ایجاد حفره‌زایی صوتی امواج فراصوت بر اندازه ذرات تاثیرگذار بود. همراستا با این نتایج باسنت و همکاران (Basnet *et al.*, 2011) گزارش کردند که اندازه ذرات لیپوزومی حاوی کورکومین با اعمال تیمار فراصوت به ۲۰۰ نانومتر کاهش یافت.

توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات یک شاخص بدون واحد و بیانگر نسبت انحراف استاندارد به متوسط اندازه ذرات است به‌طوری که مقادیر نزدیک به صفر نشانگر یکنواختی اندازه ذرات است. مقدار کمتر از ۰/۱ این شاخص نشان‌دهنده پراکندگی ذرات و مقدار بیش از ۰/۳ دلالت بر ناهمگنی ذرات دارد. توزیع اندازه ذرات تمامی لیپوزوم‌ها در محدوده ۰/۲۶۷-۰/۰۸۴ مشاهده شد که بیانگر توزیع باریک وزیکول‌های لیپوزوم بود. بر اساس داده‌های جدول ۲ اثرات خطی نسبت لستین: کلسترول، میزان

کورکومین و همچنین اثر درجه دوم میزان کورکومین بر توزیع اندازه ذرات بسیار معنی‌دار ارزیابی گردید (p<۰/۰۱). همچنین اثر خطی تیمار فراصوت معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). با اینکه افزایش نسبت لستین: کلسترول موجب یکنواختی اندازه ذرات شد، اما افزایش زمان تیمار فراصوت باعث افزایش توزیع اندازه ذرات گردید. پاینی و همکاران (Paini *et al*., 2015) اعلام کردند که افزایش زمان فراصوت موجب کاهش اندازه ذرات لیپوزومی شد در حالی که تاثیر ناچیزی بر توزیع اندازه ذرات داشت (Paini *et al*., 2015). همچنین جین و همکاران (Jin *et al*., 2016) گزارش کردند که اعمال بیش حد تیمار فراصوت موجب تخریب دیواره فسفولیپیدی و گستردگی توزیع اندازه ذرات می شود. از طرفی با افزایش نسبت لستین به کلسترول، کلسترول تمایل دارد که به‌طور منظم در بین دو لایه غشایی به موازات زنجیره‌های هیدروکربنی فسفولیپیدها توزیع شود و باعث منظم شدن ساختار شود (Mosca *et al*., 2011). با افزایش کورکومین از ۱۵ به ۳۷/۵ میلی‌گرم، توزیع اندازه ذرات کاهش یافت و با افزایش هرچه بیشتر کورکومین تا ۶۰ میلی‌گرم، غیریکنواختی را افزایش داد. احتمالا بارگذاری بیشتر دارو منجر به اثرات بی‌ثبات‌کننده غشا بر روی لیپوزوم‌ها شده و غیریکنواخت شدند (Jain *et al*., 2012). متغیر وابسته توزیع اندازه ذرات تحت تاثیر هیچ یک از اثرات متقابل متغیرهای مستقل قرار نگرفت. رابطه بین توزیع اندازه ذرات با متغیرهای مستقل فرآیند به صورت دو به دو و در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل ۲ نشان داده شده است.

$$PDI= +0.12- 0.020*B- 0.034*C+ 0.011*D+ 0.077*C^2$$



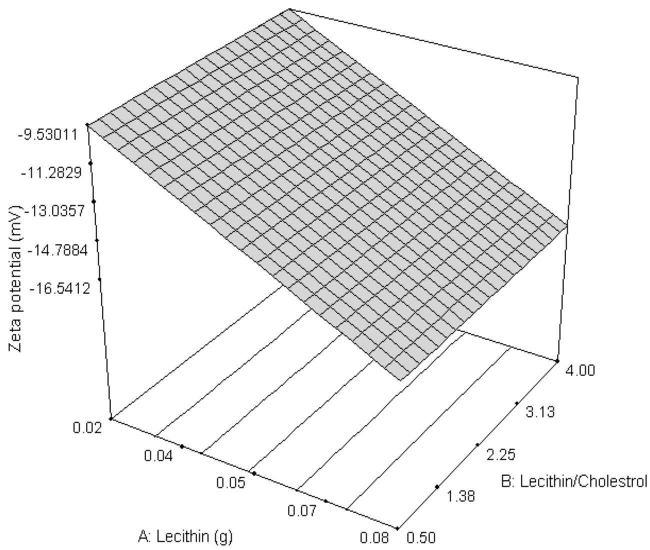
شکل ۲- نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لسیتین، نسبت لسیتین: کلسترول، میزان کورکومین و تیمار فراصوت بر توزیع اندازه ذرات لیپوزوم

Figure 2- Response surface graphs of variable effect of lecithin, lecithin: cholesterol ratio, curcumin amount and ultrasound treatment on liposome particle size distribution

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون‌ها است زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است. تنها اثر خطی میزان لستین تاثیر بسیار معنی‌داری بر میزان پتانسیل زتا داشت (p< ۰/۰۰۰۱). ارتباط پتانسیل زتا به صورت دو به دو در نقطه مرکزی متغییر سوم در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشخص است با افزایش میزان لستین، پتانسیل زتا کاهش یافت. گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار کرده و گروه کولین که دارای بار مثبت می‌باشد به داخل غشا کشیده می‌شود و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا کشیده آمده و باعث افزایش بار منفی و دفع الکترواستاتیک ذرات می‌گردد (Makino *et al*., 1991). مقدار پتانسیل زتای لیپوزوم‌های حاوی کورکومین در این پژوهش در بازه ۱۶/۵۴- تا ۱۹/۸۱- اندازه‌گیری شد. لیو و همکاران (Liu *et al*., 2015) پتانسیل زتای لیپوزوم‌های حاوی کورکومین را ۴/۶۳± ۲۴/۳۷- گزارش کردند. مطالعات پیشینه پژوهشی، هنگامی که قدر مطلق پتانسیل زتا به دلیل دافعه الکتریکی بین ذرات بیشتر از ۳۰ میلی‌ولت

باشد، پراکندگی ذرات را پایدار می‌داند. از سوی دیگر برخی پژوهشگران ادعا می‌کنند که لیپوزوم‌هایی که مقدار پتانسیل زتای آن بالاتر از ۲۰ میلی‌ولت باشد پایدار است (Laouini *et al*., 2011; Balanč *et al*., 2016). با این حال، برخی از مطالعات پایداری سیستم لیپوزومی را حتی با مقدار پتانسیل زتا پایین نشان دادند، بنابراین مقدار بالقوه زتا تنها عاملی نیست که بر پایداری لیپوزوم‌ها تاثیر می‌گذارد (Zou *et al*., 2014).



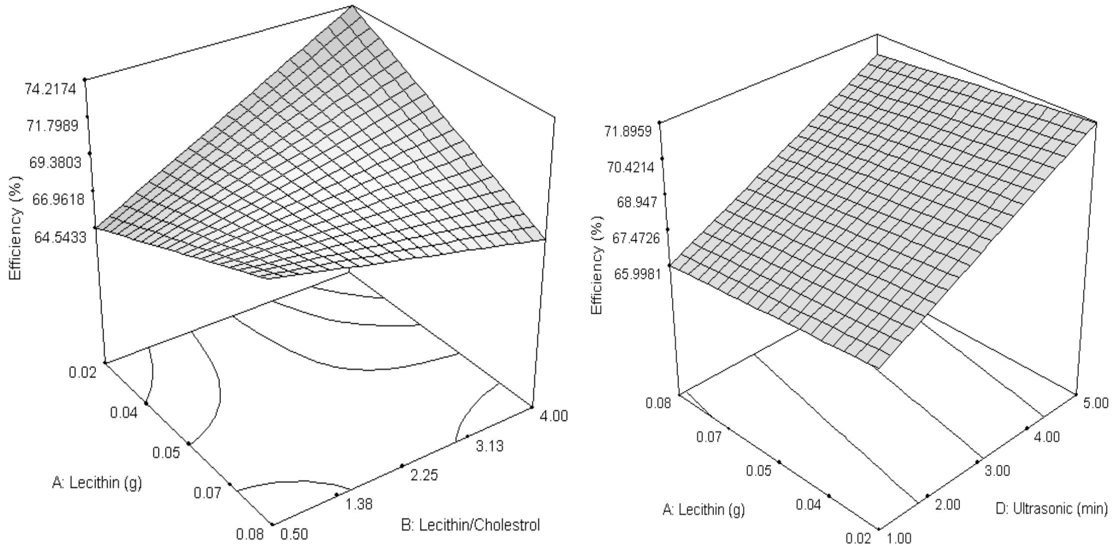
شکل ۳- نمودار سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لسیتین و نسبت لسیتین: کلسترول بر پتانسیل زتای لیپوزوم

Fig. 3- Response surface diagram of the variable effect of lecithin and lecithin:cholesterol ratio on liposome zeta potential

بازده درون‌پوشانی

عوامل مختلفی بر کارایی درون پوشانی ماده موثره در لیپوزوم تاثیرگذار هستند که به ویژگی‌های خود لیپوزوم (حجم قسمت آبی، سفتی غشاء، سطح غشاء و روش تولید) و ماده کپسوله شده (آبدوست یا آبگریز بودن ماده کپسوله شده و تمایل به برهمکنش با غشای دو لایه ای لیپوزوم) بستگی دارند (Mozafari *et al*., 2008). نتایج نشان داد که تاثیر لسیتین، تیمار فراصوت و اثر متقابل میزان لستین و نسبت لستین: کلسترول بسیار معنی‌دار بود ($p<0/01$)، در حالی که میزان نسبت لستین: کلسترول به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر بازده درون پوشانی نداشت ($p>0/05$) (شکل ۴). احتمالا افزایش لسیتین منجر به محیطی متراکم با حرکت آزاد کمتر ترکیبات فنلی شده که منجر به کاهش عملکرد به دام افتادن می‌گردد (Huh *et al*., 1996; Rafiee *et al*., 2017) از طرفی سفت شدن غشای لیپوزومی و پر شدن فضای دو لایه به علت حضور کلسترول می‌تواند باعث کاهش بارگذاری مواد فعال آبگریز در آن شده به‌طوری که کلسترول با ماده موثره آبگریز برای پر کردن فضای بین لایه‌ای رقابت می‌کند (Chen *et al*., 2019). همچنین ال-سامالیگی و همکاران (El-Samaligy *et al*., 2006). اعلام کردند که افزایش بیش از غلظت حد کلسترول می‌تواند ساختار خطی منظم غشای لیپوزومی را مختل کند و در نتیجه موجب کاهش کارایی بارگذاری داروی لیپوتروپیک سیلی مارین در لیپوزوم شود (El-Samaligy *et al*., 2006). همانطور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود کورکومین هیچ تاثیر معنی‌داری بر بازده درون پوشانی نداشت، نتایج پژوهشگران نشان می‌دهد که سطوح نسبتا پایین کورکومین می‌تواند کاملا در حوزه آبگریز داخل دو لایه فسفولیپیدی گنجانده شود اما افزایش بیش از حد کورکومین باعث اختلال در دو لایه فسفولیپیدی و بالتبع آن تغییر ساختار لیپوزوم‌ها شده و موجب کاهش ظرفیت آنها می‌شود (Cheng *et al*., 2017). افزایش زمان امواج فراصوت موجب افزایش کارایی درون‌پوشانی کورکومین در لیپوزوم گردید. چن و چنگ (Chen and Chang, 2020) مشاهده کردند که تیمار فراصوت هیچ تاثیر معنی‌داری بر کارایی درون‌پوشانی عصاره استخراج شده از گلبرگ *Clitoria ternatea* درون لیپوزوم نداشت. بازده درون پوشانی کورکومین در لیپوزوم ۵۹/۴۷- ۷۶/۸۲ درصد اندازه‌گیری شد در حالی که لی و همکاران (Li *et al*., 2017) گزارش کردند که توانایی لیپوزوم‌ها برای درون‌پوشانی کورکومین ۱/۶۵± ۸۸/۷۵ درصد بود. این تفاوت را می‌توان به نوع و ویژگی‌های ساختاری فسفولیپید (اشباع و طول زنجیره هیدروکربن اسیدهای چرب)، روش آماده‌سازی و سایر پارامترها نسبت داد (Hasan *et al*., 2014).

Efficiency= +68.97- 0.43*A+ 1.41*B+ 2.52*D- 3.42*AB



شکل ٤- نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لسیتین، نسبت لسیتین: کلسترول و تیمار فراصوت بر بازده درون پوشانی ذرات لیپوزومی
Fig. 4- Response surface diagrams of the variable effect of lecithin, lecithin: cholesterol ratio and ultrasound treatment on the encapsulation efficiency of liposomal particles

بهینه‌یابی

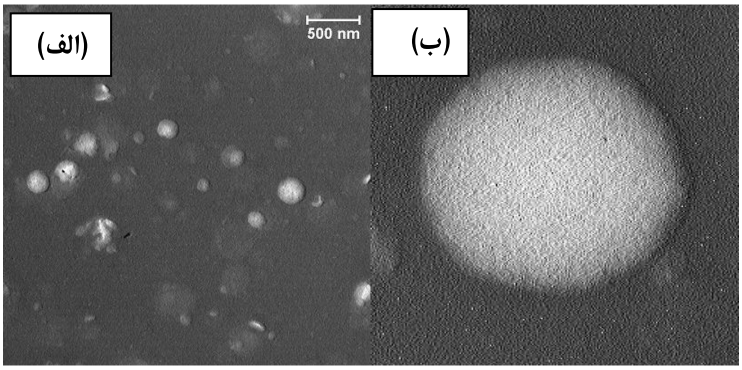
شرایط بهینه تهیه لیپوزوم بر پاسخ‌ها از طریق بهینه‌یابی با درجه مطلوبیت ۰/۷۵۹ تعیین شد. کمینه نمودن اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا و بیشینه نمودن بازده درون پوشانی کورکومین در محدوده متغیرهای مستقل به‌عنوان اهداف مورد نظر آزمایشات در تجزیه و تحلیل‌های آماری مورد نظر قرار گرفت. برای اطمینان از صحت شرایط، آزمایش در شرایط بهینه تکرارگردید. نتایج پیشنهاد شده توسط نرم افزار در جدول ۵ آورده شده است. نقاط پیش‌بینی شده در آزمایشگاه با ۲ تکرار مورد آزمون قرار گرفت. با انجام آزمون t مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین پیش‌بینی نرم‌افزار و نتایج آزمایشگاهی وجود نداشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده و آنالیز آماری می‌توان ادعا کرد نتایج به‌دست آمده بر روی مدل انتخاب شده به‌خوبی برازش شده‌اند و نتایج حاصل از نظر آماری مورد اعتماد می‌باشد. در نقطه بهینه، تهیه لیپوزوم در شرایط میزان لستین ۰/۰۸ گرم، نسبت لستین: کلسترول ۴:۱، میزان کورکومین ۴/۱۶ میلی‌گرم و تیمار فراصوت ۵ دقیقه انجام شد.

جدول ۵- کمینه و بیشنه پاسخ‌های به‌دست‌آمده بر اساس طرح سطح پاسخ بهینه‌یابی
Table 5- The minimum and maximum responses obtained based on the optimization response level plan

Response پاسخ	Minimum value مقدار کمینه	Predicted value مقدار پیش‌بینی شده	Maximum value مقدار بیشینه
Particle size اندازه ذرات	210	214.17	286.32
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	0.08	0.11	0.27
Zeta potential پتانسیل زتا	-19.81	-16.54	-8.19
Efficiency راندمان	59.47	69.02	76.82

مورفولوژی لیپوزوم

مورفولوژی سوسپانسیون لیپوزوم بهینه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. همانطور که در شکل ۵ مشخص است لیپوزوم‌ها به صورت ذرات تک لایه، کروی شکل و بدون پارگی غشاء هستند. این امر باعث می‌شود که ماهیت دو لایه وزیکول‌ها به وضوح در این میکروگراف قابل مشاهده باشد. اندازه ذرات به‌دست آمده از این روش (۰/۱۶± ۲۰۸/۳۳۴) با داده‌های حاصل از روش پراکندگی دینامیکی نور همراستا بود.



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری لیپوزوم بهینه حاوی کورکومین (الف: ×۴۰۰۰، ب: × ۵۰۰۰)

Fig. 5- Transmission electron microscopy image of optimal liposome containing curcumin (A: ×4000, B: ×5000

طیف‌سنجی مادون قرمز

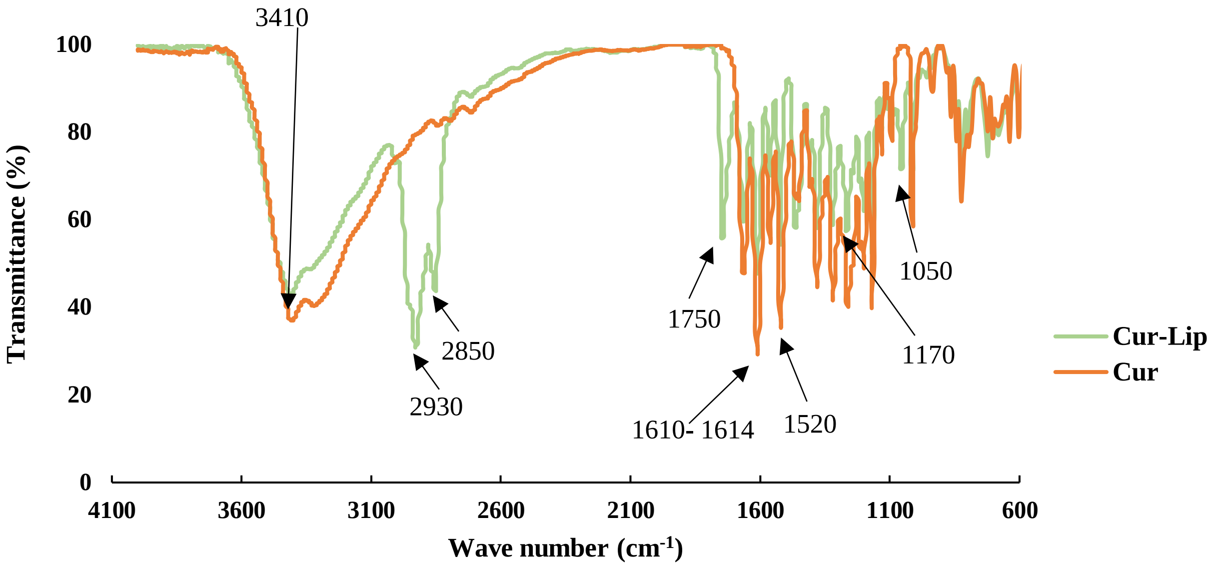
تجزیه و تحلیل طیف مادون قرمز به‌عنوان یک تکنیک سریع و غیرمخرب برای ارزیابی کورکومین و لیپوزوم حاوی کورکومین استفاده شد. همانطور که برای کورکومین خالص در شکل ۶ مشاهده می‌شود، جذب در ناحیه ۳۴۱۰ cm^{-1} مربوط به کشش ارتعاشی گروه‌های حلقه بنزن بوده و پیک ایجاد شده در طول موج ۱۲۶۰ cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش گروه آروماتیک می‌باشد. طیف‌سنجی مادون قرمز همچنین ارتعاش گروه‌های C=O (۱۵۲۰ cm^{-1})، C-O-H اینولیک (۱۳۸۰ cm^{-1})، مشخصه‌های C-C و C-O (۱۶۱۰ cm^{-1})، ارتعاش کششی آروماتیک متقارن حلقه C-C (۱۶۱۴ cm^{-1}) را نشان داد (Darandale and Vavia, 2013). برای لیپوزوم حامل کورکومین، جذب در ناحیه ۲۸۵۰ cm^{-1} و ۲۹۳۰ cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه CH_2 در کلسترول است. علاوه بر این پیک ایجاد شده در طول موج ۱۷۵۰ cm^{-1} بیانگر حضور گروه‌های C=O در زنجیره آسیل لیپید می باشد (Tai *et al.*, 2020). پیک‌های ایجاد شده در ۱۰۵۰ cm^{-1} و ۱۱۷۰ cm^{-1} به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن PO_2^- مربوط می‌شود که نشان‌دهنده فسفولیپید لیپوزوم است (Liu *et al.*, 2015). همانطور که در شکل مشخص است برخی از پیک‌های کورکومین آزاد از جمله ۱۶۱۰ cm^{-1} (C-C و C-O) و ۱۶۱۴ cm^{-1} (ارتعاش کششی آروماتیک متقارن) هنگامی که در لیپوزوم به دام افتاده ناپدید شده است و شدت پیک کشش ارتعاشی گروه‌های حلقه بنزن در طول موج ۳۴۱۰ cm^{-1} کاهش یافته است. از نتایج می‌توان دریافت که از طریق پیوند هیدروژنی در وزیکول دو لایه‌ای لیپوزوم، حلقه فنولی کورکومین با گروه سر فسفولیپید و همچنین برهمکنش‌های آبگریز حلقه‌های آروماتیک با زنجیره های آسیل فسفولیپید، کورکومین در لیپوزوم به دام افتاده است (Hasan *et al.*, 2016).

الگوی افتراق اشعه ایکس

الگوی افتراق اشعه ایکس جهت ارزیابی ماهیت فیزیکی کورکومین استفاده شد (شکل ۷). برای کورکومین در زاویه ۱۰/۸، ۱۲/۵۹، ۱۷/۲۶، ۲۴/۱۹و ۲۷/۶۸ درجه (2θ) پیک‌هایی با الگوی پراش تیز و باریک با شدت قوی تشخیص داده شد که ساختار بسیار کریستالی کورکومین را آشکار می‌کند که این نتایج همراستا با یافته‌های شیخ و همکاران، (Shaikh *et al.*, 2009) بود. با این حال، زمانی که کورکومین در سیستم لیپوزومی به دام افتاده بود، پیک‌های کورکومین غیرکریستالی مشاهده شد و حالت آمورف کورکومین را آشکار کرد. پدیده مشابهی در مطالعات قبلی مشخص شده است و شواهدی ارائه می‌دهد که ساختار کریستالی پس از محصور شدن در لیپوزوم به حالت آمورف تبدیل شده است (Liu *et al.*, 2015). با این حال پیک ایجاد شده برای کورکومین در طیف XRD لیپوزوم حاوی کورکومین مشاهده نشد که احتمالا ناشی از حضور کورکومین به حالت آمورف در داخل ماتریکس لیپوزوم است (Liu *et al.*, 2015). ویجیانی و همکاران (Wijiani *et al.*, 2020) اظهار داشتن که حالت آمورف کورکومین بعد از درون‌پوشانی باعث افزایش پایداری و حلالیت در آب می‌شود. این نتایج مشابه یافته‌های گزارش شده چنگ و همکاران (Cheng *et al.*, 2017) برای درون پوشانی کردن کورکومین درون لیپوزوم بود.

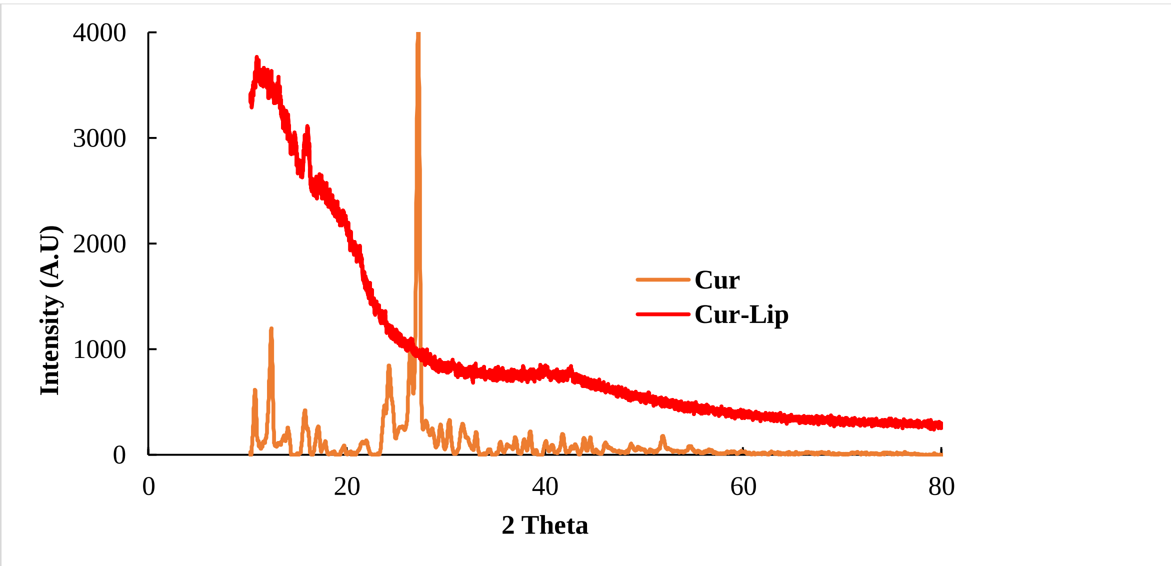
پایداری فیزیکی

پایداری فیزیکی لیپوزوم ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعددی مانند یکپارچگی لیپوزوم، توزیع اندازه ذرات، مقدار و ماهیت فسفولیپید و پایدارکننده مورد استفاده، شرایط محیطی از جمله قدرت یونی و دما باشد (Anderson and Omri, 2004).



شکل ٦- طیف سنجی مادون قرمز لیپوزوم بهینه حاوی کورکومین و کورکومین خالص

Fig. 6- Infrared spectroscopy of optimized liposome containing curcumin and pure curcumin

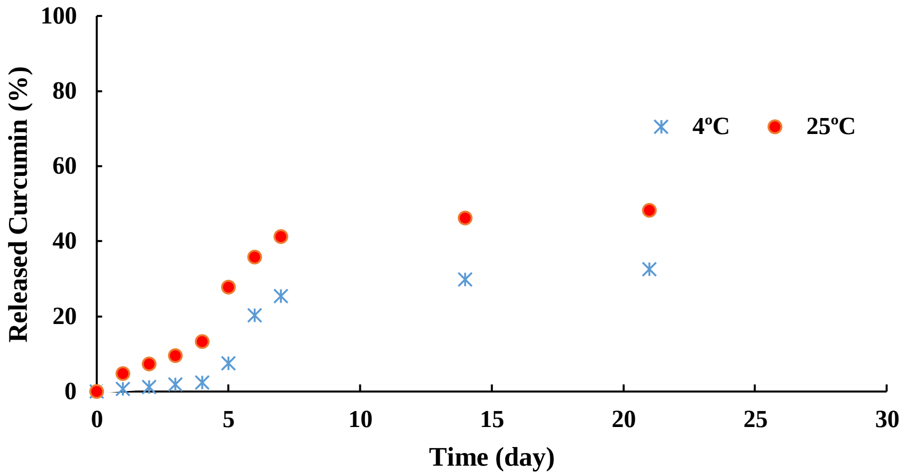


شکل ۷- الگوی پراش اشعه ایکس لیپوزوم بهینه حاوی کورکومین و کورکومین خالص

Fig. 7- X-ray diffraction pattern of optimal liposome containing curcumin and pure curcumin

ارزیابی انتشار و خروج کورکومین از ساختار لیپوزوم طی زمان در دو دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و محیط نشان داد که در ۳ اولیه کمتر از ۱۰ درصد از کورکومین در هر دو دما از لیپوزوم خارج شدند (شکل ۸) که می‌تواند به علت وجود پیوند هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل مولکول کلسترول و گروه کربونیل موجود در مولکول فسفولیپید باشد که منجر به کاهش حرکت آزادانه زنجیره های آسیل و در نتیجه کاهش سیالیت و نفوذپذیری غشای لیپیدی و افزایش پایداری و تثبیت ساختار غشای لیپوزوم شده است (Sulkowski *et al*., 2005).

گزارش شده است درون پوشانی مواد لیپوفیل بعد از کپسوله شدن در دو لایه‌ی فسفولیپیدی باعث کاهش سرعت رهایش در طی زمان می‌شود (Xia and Xu, 2005). بعد از گذشت ۲۵ روز رهایش کورکومین به شدت افزایش یافت و این میزان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود (شکل ۸)، همچنین توده‌ای شدن ذرات در دمای محیط مشاهده گردید که این پدیده احتمالا به پایین بودن پتانسیل زتای ذرات مربوط می شود. کاهش کورکومین درون پو شانی شده در طی زمان می‌تواند به بی‌نظمی بیشتر و نظم‌گیری مجدد زنجیره‌های فسفولیپیدی در اثر حضور ترکیب فعال در دو لایه فسفولیپیدی نسبت داده شود (Taylor *et al.*, 2005). نتایج نشان داد که افزایش دما باعث تغییر خصوصیت نفوذپذیری و حرکات براونی لیپیدها در ساختار لیپوزوم می شود (Taylor *et al.*, 2005). با افزایش دما گروه‌های سر لیپیدی تغییر آرایش داده و گروه‌های فسفاتیدیل در معرض محیط قرار می‌گیرند (Fathi *et al.*, 2012).



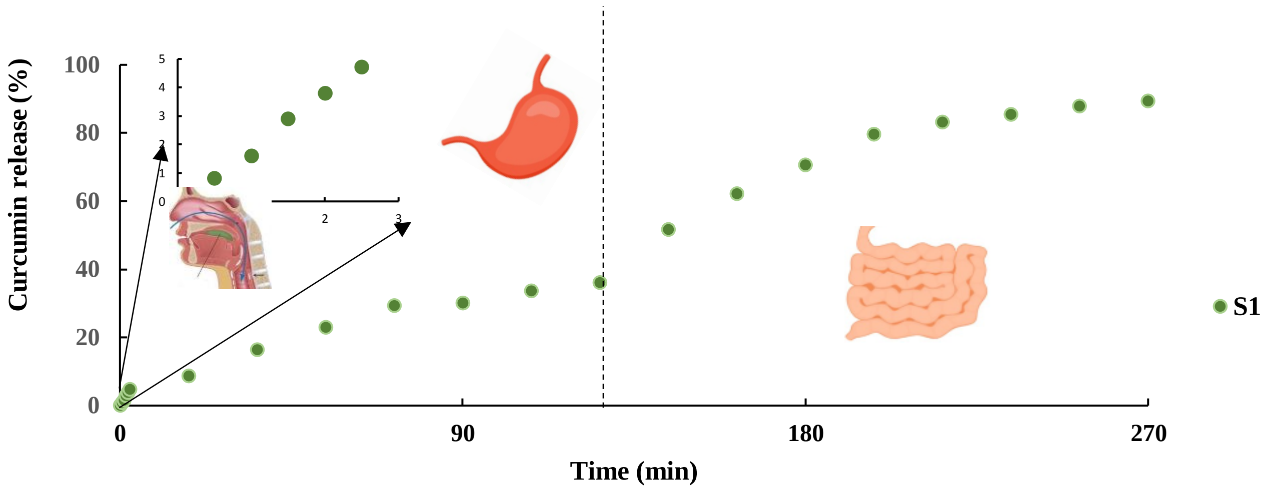
شکل ۸- میزان رهایش کورکومین از لیپوزوم طی زمان در دو دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد
Fig. 8- Curcumin release rate from liposome over time at two temperatures of 4 and 25 degrees Celsius

عملکرد آزادسازی آزمایشگاهی در هضم شبیه‌سازی شده و ارزیابی زیست دسترسی

آزادسازی کورکومین از لیپوزوم موجود در سوسپانسیون لیپوزوم با رسم صدک انتشار تجمعی در مقابل زمان آزادسازی طی سه فرآیند متوالی هضم گوارشی آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد (شکل ۹). نتایج نشان داد که مقدار بسیار کمی از کورکومین در مرحله دهان شبیه‌سازی شده منتشر شد که احتمالاً ناشی از زمان کوتاه و عدم وجود آنزیم‌های خاص برای مختل کردن دو لایه‌های فسفولیپید لیپوزوم است. آزادسازی تجمعی کورکومین از لیپوزوم در پایان فاز دهانی، شاهد خوبی برای سهم نیروی مکانیکی در فاز دهانی ارائه می‌کند. نیروی مکانیکی می تواند مستقیماً بر پارگی غشای لیپوزومی تأثیر بگذارد (Taylor *et al.*, 2005). بلافاصله پس از مرحله شبیه‌سازی شده دهانی، رفتار متفاوت کورکومین تحت pH اسیدی و محیط آنزیمی مشاهده شد. البته کورکومین توسط لیپوزوم دولایه لیپیدی باقی ماند. تغییرات مربوطه در غشای لیپوزوم به ترکیب نمک‌های یونی، pH و آنزیم‌های گوارشی نسبت داده می‌شود که بر غربالگری الکترواستاتیک، تجمع لیپوزوم و در نتیجه نشت قابل‌توجه ترکیبات کپسوله‌شده تأثیر می‌گذارد (Tan *et al.*, 2014). اگرچه آنزیم پپسین قادر به نفوذ به غشای لیپوزوم نیست، شرایط اسیدی زاویه گروه‌های سر و دم لیپیدها را تغییر می‌دهد و منجر به تغییر در بار سطحی لیپوزوم‌ها می‌شود (Lähdesmäki *et al.*, 2010). علاوه بر این، چنگ و همکاران (Cheng *et al.*, 2019) گزارش کردند که وضعیت یونیزاسیون گروه‌های کربوکسیل و آمینه روی گروه‌های سر فسفولیپید لیپوزوم‌های حاوی کورکومین به pH وابسته است. در هضم شبیه‌سازی شده روده کوچک، آزادسازی کورکومین از وزیکول‌های لیپوزوم باقی مانده پس از هضم معده به شدت افزایش یافت. این افزایش ناگهانی به دلیل وجود نمک‌های صفراوی به‌عنوان یک عامل امولسیون‌کننده است که می‌تواند لیپوزوم را با مکانیسم ورود به فسفولیپیدهای لیپوزوم از بین ببرد که در نتیجه غشای فسفولیپید را مختل کرده و غشا را سیال‌تر می‌کند (Maherani *et al.*, 2013). علاوه بر این، لیپاز پانکراس بر روی سطح لیپیدها جذب

می‌شود و سپس فسفولیپید را به لیزوفسفولیپیدهای ۲–آسیل و ۱–آسیل و اسیدهای چرب آزاد هیدرولیز می کند که ممکن است دلیل دیگری برای افزایش تخریب لیپوزوم‌ها باشد (Liu *et al.*, 2015).

جهت اطلاع از مکانیسم رهایش کورکومین از لیپوزوم در شرایط دستگاه گوارشی انسان، مدل‌های ریاضی کینتیکی مختلفی با داده‌های تجربی رهایش کورکومین برازش شد. پارامترهای حاصل از مدل‌های تجربی درجه صفر، هیگوچی، کورسمر- پپاس و کوپچا در جدول ۶ آورده شده است. با توجه به ضریب تبیین، مدل کینتیکی پپاس–سالهین با ضریب تبیین بیش از ۰/۹۹ برای توصیف کنتیک رهایش کورکومین از لیپوزوم در فازهای سه گانه دستگاه گوارش انتخاب شد. در این معادله K_1 و K_2 ثابت کینتیکی فیک و ثابت نرخ فرسایش است. با توجه به اینکه در تمام سه فاز دستگاه گوارش (دهان، معده و روده کوچک) نسبت K_1/K_2 بالاتر از ۱ بود رهایش بر اساس مکانیسم نفوذ فیک رخ داده است.



شکل ۹- رفتار رهایش کورکومین از لیپوزوم بهینه تحت شرایط شبیه‌سازی شده دهان، معده و روده

Fig. 9- Curcumin release behavior from the optimal liposome under simulated mouth, stomach and intestinal conditions

جدول ٦- پارامترهای حاصل از برازش مدل‌های مختلف بر نتایج تجربی برای رهایش کورکومین از لیپوزوم در شرایط شبیه سازی دستگاه گوارش

Table 6- The parameters obtained by fitting different models on the experimental results for the release of curcumin from liposome in the conditions of simulating the digestive system

	Zero-order		Higuchi		Kupcha			Peppas sahlin			
	K (min^{-1})	R^2	K(min$^{1/2}$)	R^2	A	B	R^2	K_1	K_2	m	R^2
Mouth دهان	1.87	0.99	2.47	0.85	-0.43	2.18	0.99	2.67	-0.64	1.50	0.99
Stomach معده	0.35	0.55	3.47	0.96	4.80	-0.14	0.99	4.63	-0.001	0.46	0.99
Intestine روده	-	-	8.27	0.84	13.91	-0.54	0.90	18.84	-0.002	0.34	0.99

نتیجه‌گیری

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (میزان کورکومین، میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول و تیمار فراصوت) بر متغیرهای وابسته (تغییرات اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی کورکومین) طی فرآیند تهیه لیپوزوم از طرح سطح پاسخ استفاده شد. بر اساس مدل‌های ارائه شده برای هر پاسخ، اثرات خطی میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول، میزان کورکومین و تیمار فراصوت و همچنین اثر درجه دوم نسبت لستین: کلسترول برای اندازه ذرات لیپوزوم بسیار معنی‌دار ($p<0/01$) به‌دست آمد. با اینکه افزایش نسبت لستین: کلسترول موجب یکنواختی اندازه ذرات شد، اما افزایش زمان تیمار فراصوت باعث افزایش توزیع اندازه ذرات گردید. پتانسیل زتا تنها متاثر از متغیر مستقل میزان لستین بود. همچنین تاثیر لستین، تیمار فراصوت

و اثر متقابل میزان لستین و نسبت لستین: کلسترول بسیار معنی‌دار بر بازده ریزپوشانی بود. در نقطه بهینه، شرایط تهیه لیپوزوم با میزان ۰/۰۸ گرم لستین، ۱:۴ نسبت لستین: کلسترول، ۴/۱۶ میلی‌گرم کورکومین با ۵ دقیقه تیمار فراصوت تعیین شد. بالاترین بازده درون پوشانی (۱/۰۱± ۶۹/۰۱۹ درصد) و کمترین اندازه ذرات (۰/۰۹± ۲۱۴/۱۷۴ نانومتر)، توزیع اندازه ذرات (۰/۰۲± ۰/۱۰۵) و پتانسیل زتا (۰/۳۱± ۱۶/۵۴۱- میلی‌ولت) برای لیپوزوم بهینه‌یابی شده، بدست آمد. این لیپوزوم‌ها به صورت ذرات تک لایه، کروی شکل و بدون پارگی غشاء بودند و به خوبی کورکومین کریستالی در بین دو لایه فسفولیپیدی آن به دام افتاده بود. اگرچه که کورکومین بعد از به محصور شدن در بین دو لایه لیپوزومی به حالت آمورف تبدیل شده بود. ارزیابی انتشار و خروج کورکومین از ساختار لیپوزوم طی زمان در دو دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و محیط نشان داد که در ۳ اولیه کمتر از ۱۰ درصد از کورکومین در هر دو دما از لیپوزوم خارج شده بودند و میزان رهایش کورکومین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود. رهایش کورکومین ازسیستم حامل لیپوزوم در تمام سه فاز دستگاه گوارش (دهان، معده و روده کوچک) بر اساس مکانیسم انتشار رخ داده بود

منابع

1. Adhikary, R., Barnes, C.A., Trampel, R.L., Wallace, S.J., Kee, T.W., & Petrich, J.W. (2011). Photoinduced trans-to-cis isomerization of cyclocurcumin. *The Journal of Physical Chemistry B 115*(36): 10707-10714. https://doi.org/10.1021/jp200080s.
2. Ahmed, K., Li, Y., McClements, D.J., & Xiao, H. (2012). Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry 132*(2): 799-807. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039.
3. Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., & Aggarwal, B.B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics 4*(6): 807-818. https://doi.org/10.1021/mp700113r.
4. Anderson, M., & Omri, A. (2004). The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Delivery 11*(1): 33-39. https://doi.org/10.1080/10717540490265243.
5. Balanč, B., Trifković, K., Đorđević, V., Marković, S., Pjanović, R., Nedović, V., & Bugarski, B. (2016). Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. *Food Hydrocolloids* 61: 832-842. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.005.
6. Basnet, P., Hussain, H., Tho, I., & Skalko-Basnet, N. (2012). Liposomal delivery system enhances anti-inflammatory properties of curcumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences 101*(2): 598-609. https://doi.org/10.1002/jps.22785.
7. Chavhan, S.S., Petkar, K.C., & Sawant, K. (2011). Nanosuspensions in drug delivery: recent advances, patent scenarios, and commercialization aspects. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems 28*(5).
8. Chen, H.W., & Chang, Y.W. (2020). Encapsulation of Clitoria ternatea extract in liposomes by synergistic combination of probe-type ultrasonication and high-pressure processing. *Journal of Food Safety 40*(6): e12859. https://doi.org/10.1111/jfs.12859.
9. Chen, L., Bai, G., Yang, S., Yang, R., Zhao, G., Xu, C., & Leung, W. (2014). Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability. *Food Research International* 62: 1147-1153. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.054.
10. Chen, S., Li, Q., McClements, D.J., Han, Y., Dai, L., Mao, L., & Gao, Y. (2020). Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids* 99*:* 105334. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105334.
11. Chen, W., Zou, M., Ma, X., Lv, R., Ding, T., & Liu, D. (2019). Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for optimum antioxidant activity. *Journal of Food Science 84*(1): 111-120. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14405
12. Cheng, C., Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., & Liu, C. (2017). Improved bioavailability of curcumin in liposomes prepared using a pH-driven, organic solvent-free, easily scalable process. *RSC Advances 7*(42): 25978-25986. https://doi.org/10.1039/C7RA02861J.
13. Cheng, C., Wu, Z., McClements, D.J., Zou, L., Peng, S., Zhou, W., & Liu, W. (2019). Improvement on stability, loading capacity and sustained release of rhamnolipids modified curcumin liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 183*:* 110460. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110460.
14. Chi, J., Ge, J., Yue, X., Liang, J., Sun, Y., Gao, X., & Yue, P. (2019). Preparation of nanoliposomal carriers to improve the stability of anthocyanins. *LWT*, *109*, 101-107. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.070.

15. Darandale, S.S., & Vavia, P.R. (2013). Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 75*(3-4): 315-322. https://doi.org/10.1007/s10847-012-0186-9.
16. El Khoury, E. D., & Patra, D. (2013). Ionic liquid expedites partition of curcumin into solid gel phase but discourages partition into liquid crystalline phase of 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *The Journal of Physical Chemistry B*, *117*(33), 9699-9708. https://doi.org/10.1021/jp4061413
17. El-Samaligy, M. S., Afifi, N. N., & Mahmoud, E. A. (2006). Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. *International journal of pharmaceutics*, *319*(1-2), 121-129. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.04.023
18. Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, *23*(1), 13-27. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003
19. Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., ... & Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International journal of pharmaceutics*, *461*(1-2), 519-528. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.007
20. Hasan, M., Messaoud, G. B., Michaux, F., Tamayol, A., Kahn, C. J., Belhaj, N., ... & Arab-Tehrany, E. (2016). Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: Study of lipid–polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. *RSC advances*, *6*(51), 45290-45304. https://doi.org/10.1039/C6RA05574E
21. Huh, N. W., Porter, N. A., McIntosh, T. J., & Simon, S. A. (1996). The interaction of polyphenols with bilayers: conditions for increasing bilayer adhesion. *Biophysical journal*, *71*(6), 3261-3277. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79519-X
22. Jahanshahi, M., & Mehravar, R. (2009). Protein Nanoparticles as a Novel System for Food Science and Technology. *Dynam Biochem Process Biotechnol Mol Biol*, *3*(2), 1-11.
23. Jain, S., Kumar, D., Swarnakar, N. K., & Thanki, K. (2012). Polyelectrolyte stabilized multilayered liposomes for oral delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, *33*(28), 6758-6768. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.026
24. Jin, H. H., Lu, Q., & Jiang, J. G. (2016). Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. *Journal of dairy science*, *99*(3), 1780-1790. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10391
25. Karewicz, A., Bielska, D., Gzyl-Malcher, B., Kepczynski, M., Lach, R., & Nowakowska, M. (2011). Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *88*(1), 231-239. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.037
26. Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., and Hofer, F. 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: *An essential tool for characterisation and stability assessment. Micron*, 43, 43(2-3), 85–103. https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014
27. Lähdesmäki, K., Ollila, O. S., Koivuniemi, A., Kovanen, P. T., & Hyvönen, M. T. (2010). Membrane simulations mimicking acidic pH reveal increased thickness and negative curvature in a bilayer consisting of lysophosphatidylcholines and free fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1798*(5), 938-946. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.020
28. Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2011). Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor—application to spironolactone encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, *415*(1-2), 53-61. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.034
29. Li, R., Deng, L., Cai, Z., Zhang, S., Wang, K., Li, L., ... & Zhou, C. (2017). Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin. *Materials science and engineering: C*, *80*, 156-164. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.136
30. Li, Z. L., Peng, S. F., Chen, X., Zhu, Y. Q., Zou, L. Q., Liu, W., & Liu, C. M. (2018). Pluronics modified liposomes for curcumin encapsulation: Sustained release, stability and bioaccessibility. *Food research international*, *108*, 246-253. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.048
31. Lin, C. C., Lin, H. Y., Chen, H. C., Yu, M. W., & Lee, M. H. (2009). Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry*, *116*(4), 923-928. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.052
32. Liu, Y., Liu, D., Zhu, L., Gan, Q., & Le, X. (2015). Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food research international*, *74*, 97-105. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.024
33. Lu, Q., Li, D. C., & Jiang, J. G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(24), 13004-13011. https://doi.org/10.1021/jf203194w

34. Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J. G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT-Food science and technology*, *57*(2), 686-695. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.044
35. Madane, R.G., & Mahajan, H.S. (2016). Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. *Drug Delivery 23*(4): 1326-1334. https://doi.org/10.3109/10717544.2014.975382.
36. Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirolomoom, A., Geny, D., & Linder, M. (2013). Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie 95*(11): 2018-2033. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.006.
37. Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., & Kondo, T. (1991). Temperature and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys Chemistry* 41: 75-183. https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80017-L.
38. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezayi Mokarram, R., & Mohammadifar, M.A. (2014). Physical properties of vitamin D3-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 8*(4): 175-188.
39. Mosca, M., Ceglie, A., & Ambrosone, L. (2011). Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids 164*(2): 158-165. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.12.006.
40. Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties 11*(4): 833-844. https://doi.org/10.1080/10942910701648115.
41. Nahr, F.K., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Kafil, H.S., Hoseini, M., & Moghadam, B.E. (2019). Investigation of physicochemical properties of essential oil loaded nanoliposome for enrichment purposes. *LWT* 105*:* 282-289. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.010.
42. Nakajima, M., Wang, Z., Chaudhry, Q., Park, H.J., & Juneja, L.R. (2015). Nano-science-engineering-technology applications to food and nutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology 61*(Supplement): S180-S182.
43. Ng, Z.Y., Wong, J.Y., Panneerselvam, J., Madheswaran, T., Kumar, P., Pillay, V., & Chellappan, D.K. (2018). Assessing the potential of liposomes loaded with curcumin as a therapeutic intervention in asthma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172: 51-59. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.027.
44. Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., & Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal 79*(1): 321-327. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76294-1.
45. Paini, M., Daly, S.R., Aliakbarian, B., Fathi, A., Tehrany, E.A., Perego, P., & Valtchev, P. (2015). An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136: 1067-1072. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.038.
46. Peng, S., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D.J. (2018). Fabrication and characterization of curcumin-loaded liposomes formed from sunflower lecithin: impact of composition and environmental stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 66*(46): 12421-12430. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04136.
47. Qazi, H.J., Ye, A., Acevedo-Fani, A., & Singh, H. (2021). In vitro digestion of curcumin-nanoemulsion-enriched dairy protein matrices: Impact of the type of gel structure on the bioaccessibility of curcumin. *Food Hydrocolloids* 117: 106692. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106692.
48. Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M.A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high–valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry* 220: 115-122. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.207.
49. Ravichandran, R. (2013). Studies on dissolution behaviour of nanoparticulate curcumin formulation. https://doi.org/10.4236/anp.2013.21010.
50. Reza Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research 18*(4): 309-327. https://doi.org/10.1080/08982100802465941.
51. Schubert, M.A., Harms, M., & Müller-Goymann, C.C. (2006). Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences 27*(2-3): 226-236. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.10.004.
52. Shaikh, J., Ankola, D.D., Beniwal, V., Singh, D., & Kumar, M.R. (2009). Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences 37*(3-4): 223-230. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.02.019.

53. Sulkowski, W.W., Pentak, D., Nowak, K., & Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure* 744: 737-747. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.075.
54. Sun, M., Su, X., Ding, B., He, X., Liu, X., Yu, A., & Zhai, G. (2012). Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine 7*(7): 1085-1100. https://doi.org/10.2217/nnm.12.80.
55. Tai, K., Rappolt, M., Mao, L., Gao, Y., & Yuan, F. (2020). Stability and release performance of curcumin-loaded liposomes with varying content of hydrogenated phospholipids. *Food Chemistry* 326: 126973. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126973.
56. Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 57*(19): 9141-9146. https://doi.org/10.1021/jf9013923.
57. Tan, C., Xue, J., Lou, X., Abbas, S., Guan, Y., Feng, B., & Xia, S. (2014). Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. *Food & Function 5*(6): 1232-1240. https://doi.org/10.1039/C3FO60498E.
58. Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce B.D., & Weiss, J. (2005). Ultrasonic spectroscopy and differential scanning calorimetry of liposomal-encapsulated Nisin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 53*(22): 8722-8728. https://doi.org/10.1021/jf050726k.
59. van Ruth, S.M., & Roozen, J.P. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry* 71: 339-345. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00186-2.
60. Wijiani, N., Isadiartuti, D., Rijal, M. A. S., & Yusuf, H. (2020). Characterization and dissolution study of micellar curcumin-spray dried powder for oral delivery. *International Journal of Nanomedicine* 15: 1787.
61. Wink, M. (2010). *Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. (Second ed.).UK: Blackwell Publishing Ltd, PP. 433.
62. Xia, S., & Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. Food *Research International* 38: 289-296. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.010.
63. Zhi, K., Wang, R., Wei, J., Shan, Z., Shi, C., & Xia, X. (2021). Self-assembled micelles of dual-modified starch via hydroxypropylation and subsequent debranching with improved solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocolloids* 118: 106809. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106809.
64. Zou, L., Q., Peng, S.F., Liu, W., Gan, L., Liu, W.L., Liang, R.H., & Chen, X. (2014). Improved in vitro digestion stability of (−)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Research International* 64: 492-499. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.042.